

HIGIENA ŻYWNOCI ZWIERZĘCEGO POCHODZENIA

MARCIN SZULC, ANNA STEFANIAKOWA, BOŻENA STAŃCZAK, JANINA PEĆONEK

Wpływ napromieniowania bakterii na ich właściwości proteolityczne

Z Katedry Higieny Produktów Zwierzęcych Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR w Warszawie

Właściwości proteolityczne bakterii stanowią istotne i jednocześnie niełatwe do rozwiązania zagadnienie w dziedzinach higieny i technologii żywności. Obok przestrzegania podstawowych zasad higieny przetwórstwa spożywczego oraz równocześnie ze stosowaniem zabiegów utrwalających surowce i produkty spożywcze, na uwagę i rozpoznanie zasługują wszelkie czynniki, które mogłyby osłabić zdolności wytwarzania enzymów proteolitycznych przez bakterie, a więc — ograniczyć ich właściwości proteolityczne.

Jednym z takich czynników może być poddanie bakterii działaniu promieniowania jonizującego, w stosunkowo małych dawkach, nie powodujących obumarcia populacji bakteryjnej. W dostępnym piśmiennictwie nie spotkano żadnych informacji z tego zakresu. Opisywana praca jest kolejnym zadaniem badawczym wykonywanym przez Katedrę Higieny Produktów Zwierzęcych Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR w Warszawie, w ramach rządowego programu badawczo-rozwojowego PR-4, dotyczącym rozwiązywanego tematu: Wpływ napromieniowania na podstawowe cechy drobnoustrojów istotne dla higieny i technologii żywności.

Celem pracy było:

1. Określenie wpływu napromieniowania bakterii nieprzetwarzających na właściwości proteolityczne generacji powstałych z komórek, które przetrwały działanie promieniowania.

2. Określenie wpływu napromieniowania przetrwalników bakteryjnych na właściwości proteolityczne generacji powstałych z nie zniszczonych przetrwalników.

3. Określenie wpływu obecności białka w środowisku napromieniowania bakterii i przetrwalników na omawiane właściwości proteolityczne powstałych generacji.

Materiał i metody

Badaniom poddano następujące szczepy bakterii pochodzące z kolekcji PZH: *Proteus vulgaris* Nr 538, *Pseudomonas aeruginosa* Nr 74, *Pseudomonas aeruginosa* Nr 159, *Pseudomonas fluorescens* Nr 107, *Bacillus subtilis* Nr 729 (przetrwalniki).

Do badań używano bulionowych 24-godzinnych hodowli szczepów *Pr. vulgaris* i *Ps. aeruginosa* oraz 120-godzinnych hodowli *Ps. fluorescens*, przygotowanych wg Burzyńskiej (1, 2). Przetrwalniki *Bac. subtilis* otrzymano zgodnie z metodą podaną przez Kramera i wsp. (4) z 7-dniowej hodowli na agarze odżywcym. Zawiesinę uzyskaną po splukaniu hodowli zbu-

forowanym roztworem fizjologicznym (PBS) pasteryzowano w temp. 90°C przez 15 minut, a następnie 3-krotnie wirovano. Otrzymany osad zawieszano w PBS i ponownie pasteryzowano w temp. 90°C przez 15 minut. Zawiesinę przetrwalników schładzano i przechowywano w temp. 4°C.

We wstępnej fazie badań określano radiowrażliwość badanych szczepów bakteryjnych w środowisku bezbiałkowym (PBS) oraz białkowym (bulion o zawartości ok. 1% białka), w celu ustalenia odpowiednich dawek promieniowania X dla właściwych doświadczeń. Wielkości dawek dobierano w taki sposób, aby napromieniowanie każdego szczepu tymi dawkami powodowało w różnym stopniu (%) obumieranie bakterii, lecz aby nie powodowało zniszczenia całej populacji.

Bakterie napromieniowywano promieniami X przy następujących parametrach pracy aparatu: napięcie lampy: — 200 kV, natężenie — 20 mA, moc dawki — 0,11 Gy/sek. (1 Gy = 100 radów).

Ustalono i przyjęte we wstępnych doświadczeniach wielkości dawek napromieniowania szczepów wynosiły:

- *Pr. vulgaris*: 1, 10, 50 i 100 Gy,
- *Ps. aeruginosa*: 1, 10, 50 i 100 Gy,
- *Ps. fluorescens*: 1, 10 i 50 Gy,
- *Bac. subtilis* (przetrwalniki): 50, 100, 500 i 1000 Gy.

Wszystkie szczepy poddano napromieniowaniu w probówkach o pojemności 1 cm³, w PBS (zbuforowany roztwór fizjologiczny) oraz w bulionie o zawartości ok. 15% białka.

Po napromieniowaniu zawiesiny badanych bakterii i przetrwalników rozcieńczano (w stosunku do znanego stężenia wyjściowego) w takim stopniu, aby przy posiewach na podłoża stałe otrzymać wzrost pojedynczych kolonii, w liczbie około 20 kolonii na płytce. Wysiewano po 0,1 cm³ rozcieńczonej zawiesiny na powierzchnię 1 płytki, stosując dla badanych szczepów następujące podłoża: *Ps. aeruginosa* i *Ps. fluorescens* — podłoże Fraziera, *Pr. vulgaris* i *Bac. subtilis* — podłoże Fraziera — Ruppaa. Posiewy inkubowano w temp. 37°C przez 48 h (*Pr. vulgaris*, *Ps. aeruginosa* i *Bac. subtilis*) lub w temp. 20°C przez 48 h (*Ps. fluorescens*). Właściwości proteolityczne bakterii kontrolnych oraz napromieniowanych określano na podstawie szerokości strefy przejaśnienia wokół wyrosłych kolonii, mierzonej z dokładnością 0,5 mm. Dla dokładniejszego zaznaczenia stref przejaśnienia podłoży stosowano roztwór wodny HgCl₂ zmieszany ze stężonym HCl.

Wyniki i omówienie

Badania z każdym szczepem bakterii wykonano w 4 seriach (powtórzeniach). Z otrzymanych wyników obliczono średnie arytmetyczne dla każdej serii oddzielnie i dla wszystkich serii (powtórzeń) łącznie oraz odpowiadające im odchylenia standardowe. Opracowane wyniki podano w tab. 2 i 3, w wartościach bezwzględnych

(mm) wraz z odchyleniami standardowymi oraz w wartościach względnych (%) w stosunku do kontroli, tj. do zawiesin nie napromieniowanych.

Radiowrażliwość bakterii przy stosowanych dawkach promieniowania przedstawiono dodatkowo w tab. 1.

słabsze właściwości proteolityczne od analogicznych kolonii z zawiesin kontrolnych. W miarę zwiększania dawki napromieniowania średnie strefy proteolizy ulegały systematycznie zmniejszeniu. Zjawisko to dotyczy zarówno bakterii napromieniowanych w środowisku bezbiałko-

Tab. 1. Przeżywalność bakterii przy napromieniowaniu stosowanymi dawkami promieni X (%)

Bakterie	Bakterie nie napr. (kontrola)		Bakterie napromieniowane dawkami							
			1 Gy		10 Gy		50 Gy		100 Gy	
	PBS	B	PBS	B	PBS	B	PBS	B	PBS	B
<i>Proteus vulgaris</i> Nr 538 *)	100	100	81,9	84,3	44,7	64,8	15,7	44,6	2,1	7,8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nr 74	100	100	78,3	86,0	55,1	51,2	30,0	35,3	X	X
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nr 159	100	100	84,9	99,0	45,9	37,8	1,6	1,4	X	X
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Nr 107	100	100	71,8	65,0	50,0	47,0	2,8	2,7	X	X
<i>Bacillus subtilis</i> Nr 729 *) (przetwarzalniki)			50 Gy		100 Gy		500 Gy		1000 Gy	
	100	100	88,0	99,5	75,0	87,4	53,0	41,2	22,5	14,6

Objaśnienie: *) Wg wyników z wcześniejszych badań (5, 6).

Wyniki zestawione w tab. 1 wskazują, że wszystkie badane bakterie nieprzetwarzalniki charakteryzują się dużą radiowrażliwością na promieniowanie X. Z porównania wyników uzyskanych przy dawce 50 Gy, widać wyraźnie, że największą radiowrażliwością cechują się szczepy *Ps. aeruginosa* Nr 159 i *Ps. fluorescens* Nr 107. Radiowrażliwość szczepów *Ps. aeruginosa* Nr 74 i *Pr. vulgaris* Nr 538 jest mniejsza, co obserwowano już we wcześniejszych badaniach. Obserwacje te są na ogół zgodne z danymi z piśmiennictwa (3), z których wynika, że rodzaj *Pseudomonas* należy do bakterii o największej radiowrażliwości. Na uwagę zasługuje fakt, że już po najmniejszej stosowanej dawce (1 Gy) obserwuje się wyraźne zmniejszenie liczby rozwijających się bakterii. Zjawisko to obserwowano również w poprzednich badaniach własnych (5, 7).

Wyniki przedstawione w tab. 2 i 3 wskazują, że przy wszystkich badanych szczepach, bakterie z zawiesin napromieniowanych wykazywały

wym (PBS) jak i w bulionie. Mimo stosunkowo dużych wartości odchyżeń standardowych, ze względu na systematyczne występowanie tego zjawiska, można je uznać za udowodnioną prawidłowość. Na podkreślenie zasługuje fakt, że omawiane obniżenie właściwości proteolitycznych zarysowało się już wyraźnie przy najmniejszej stosowanej dawce (1 Gy), osiągając dla badanych szczepów wartość od 6 do 23,2%. Przy najwyższej dawce napromieniowania bakterii nieprzetwarzalniki (100 Gy), zmniejszenie właściwości proteolitycznych szczepów napromieniowanych zarówno w PBS jak i w bulionie, wynosiło średnio około 50%. Choć różnice w wielkości omawianych zmian, obserwowanych między poszczególnymi szczepami były stosunkowo niewielkie, to jednak wydaje się, że najbardziej wrażliwy w tym zakresie był szczep *Pr. vulgaris* Nr 538.

Odmienne wyniki uzyskano przy analogicznych badaniach przetwarzalników *Bac. subtilis*. Wartości przedstawione w tab. 2 i 3 wskazują,

Tab. 2. Właściwości proteolityczne bakterii napromieniowanych w PBS

Bakterie	Bakterie nie napromieniowane	Wielkość strefy proteolizy, w mm i %				
		Bakterie napromieniowane dawkami				
		1 Gy	10 Gy	50 Gy	100 Gy	
<i>Proteus vulgaris</i> Nr 538	3,26 ± 0,71 (100%)	2,60 ± 0,70 (79,8%)	2,25 ± 0,75 (69,0%)	2,02 ± 0,85 (62,0%)	1,65 ± 0,68 (50,6%)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nr 74	7,82 ± 2,02 (100%)	6,95 ± 1,58 (88,9%)	6,64 ± 1,13 (84,9%)	5,16 ± 2,0 (66,0%)	4,10 ± 1,10 (52,4%)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nr 159	6,18 ± 1,85 (100%)	5,81 ± 1,67 (94,0%)	5,71 ± 2,43 (92,4%)	4,60 ± 2,99 (88,8%)	3,50 ± 2,70 (56,6%)	
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Nr 107	3,40 ± 1,35 (100%)	2,61 ± 0,70 (76,8%)	2,80 ± 0,57 (82,4%)	2,70 ± 1,03 (79,4%)	X	
<i>Bacillus subtilis</i> Nr 729 (przetwarzalniki)			50 Gy	100 Gy	500 Gy	1000 Gy
	3,76 ± 0,93 (100%)	3,78 ± 0,97 (100,5%)	3,41 ± 0,89 (90,7%)	3,22 ± 0,93 (85,6%)	3,59 ± 0,97 (95,5%)	

że strefy proteolizy powstające wokół kolonii wyrosłych z napromieniowanych przetrwalników są zbliżone do stref wywoływanych przez bakterie kontrolne. Wprawdzie wyniki średnie wskazują na pewne zmniejszenie się stref wokół kolonii wyhodowanych z przetrwalników napromieniowanych, z nieznaczną zależnością od dawki napromieniowania, to jednak wydaje się, że obserwowane różnice są zbyt małe, aby mogły stanowić podstawę do wyciągania wniosków.

fluorescens — małymi dawkami promieniowania X powoduje obniżenie właściwości proteolitycznych generacji powstałych w koloniach. Napromieniowanie przetrwalników *Bac. subtilis* stosunkowo małymi dawkami promieniowania X nie spowodowało obniżenia właściwości proteolitycznych form wegetatywnych otrzymanych z tych przetrwalników. Godne uwagi wydaje się zaobserwowane zjawisko, że przy tych samych dawkach promieniowania, stopień obu-

Tab. 3. Właściwości proteolityczne bakterii napromieniowanych w bulionie

Bakterie	Wielkość strefy proteolizy, w mm i %				
	Bakterie nienapromieniowane	Bakterie napromieniowane dawkami			
		1 Gy	10 Gy	50 Gy	100 Gy
<i>Proteus vulgaris</i> Nr 538	3,44 ± 0,89 (100%)	2,68 ± 0,82 (77,9%)	2,38 ± 1,38 (69,2%)	1,88 ± 0,92 (54,7%)	1,40 ± 0,60 (40,7%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nr 74	7,70 ± 1,66 (100%)	7,12 ± 1,63 (92,5%)	6,31 ± 2,16 (81,9%)	5,58 ± 1,75 (72,5%)	5,10 ± 2,46 (66,2%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Nr 159	6,70 ± 2,37 (100%)	5,32 ± 2,56 (79,4%)	4,60 ± 2,73 (68,7%)	5,0 ± 1,46 (74,6%)	4,0 ± 1,54 (59,7%)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Nr 107	3,24 ± 1,72 (100%)	2,76 ± 1,34 (85,2%)	2,61 ± 1,16 (80,5%)	2,73 ± 1,32 (84,3%)	X
<i>Bacillus subtilis</i> Nr 729 (przetrwalniki)	4,52 ± 1,59 (100%)	50 Gy	100 Gy	500 Gy	1000 Gy
		4,14 ± 1,34 (91,6%)	4,30 ± 1,11 (95,1%)	3,97 ± 1,19 (87,8%)	4,04 ± 1,13 (89,4%)

Porównując wyniki zestawione w tab. 1, 2, 3 obserwowano, że napromieniowanie bakterii i przetrwalników, przy tych samych dawkach promieniowania X, powoduje w większym stopniu (%) obumieranie (lub przynajmniej brak wzrostu) populacji niż utratę właściwości proteolitycznych generacji powstałych w rozwijających się koloniach. Wskazuje to, że napromieniowane bakterie łatwiej obumierają lub przynajmniej przestają się rozwijać niż tracąc charakterystyczną cechę tworzenia enzymów proteolitycznych.

Porównanie wyników zestawionych w tab. 2 i 3 wskazuje, że strefy proteolizy powodowane przez kolonie wyrosłe z bakterii lub przetrwalników poddanych napromieniowaniu w PBS i bulionie są podobne. Można więc stwierdzić, że obecność białka lub jego brak w środowisku napromieniowania zawieszin nie wywiera znaczącego wpływu na właściwości proteolityczne namnożonych bakterii.

Jak wskazano we wstępie, w dostępnym piśmiennictwie nie spotkano żadnych danych dotyczących zagadnień będących przedmiotem i celem niniejszej pracy.

Wnioski

1. Uzyskane wyniki są dalszym potwierdzeniem faktu dużej radiowrażliwości bakterii rodzaju *Pseudomonas*.

2. Napromieniowanie bakterii nieprzetrwalnikujących — *Pr. vulgaris*, *Ps. aeruginosa* i *Ps.*

mierania populacji bakterii jest wyższy niż stopień obniżenia się ich właściwości proteolitycznych.

3. Obecność białka w środowisku napromieniowania bakterii i przetrwalników nie oddziałuje w istotny sposób na właściwości proteolityczne generacji powstałych w koloniach.

4. Wyniki niniejszej pracy sugerują potrzebę dalszych badań zmierzających do:

- poznania możliwości utrzymywania się cechy obniżonych właściwości proteolitycznych napromieniowanych bakterii w dalszych generacjach (dziedziczenia cechy),
- określenia ewentualnego znaczenia omawianego zjawiska dla podnoszenia trwałości oraz dla higieny surowców i produktów białkowych, zwłaszcza pochodzenia zwierzęcego.

Piśmiennictwo

1. Burzyńska H.: Roczniki PZH 18, 415, 1967.
2. Burzyńska H.: Roczniki PZH 20, 183, 1969.
3. Hugo W. B.: Inhibition and Destruction of the Microbial Cell. Acad. Press, London, New York 1971, s. 285.
4. Kramer J., Carter G. C., Arret B., Wilner J., Wright W. W., Kirshbaum M.: Dep. Hlth., Education and Welfare, Washington, October 1963.
5. Szulc M., Stefaniakowa A., Tropiło J., Stańczak B., Peconek J., Mierzewska H., Bielecka J.: Medycyna Wet. 35, 584, 1979.
6. Szulc M., Stefaniakowa A., Peconek J., Stańczak B., Bielecka J.: Medycyna Wet. 35, 731, 1979.
7. Szulc M., Tropiło J., Olszewski G.: Medycyna Wet. 36, 69, 1980.

Adres autora: prof. dr Marcin Szulc, ul. Bielańska 3 m. 25, 00-086 Warszawa.

Шульц М., Стефаникова А., Станьчак В., Пенцонек Я. — Влияние облучения бактерий на их протеолитические свойства.

Исследовали активные протеолитические штаммы бактерий: *Pr. vulgaris*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *Bac. subtilis* (споры). Взвеси бактерий и спор облучали в безбелковой и белковой среде лучами. X. Величины доз облучения составляли 1—100 Gy, а в случае спор *Bac. subtilis* 50—1000 Gy. В результате проведенных исследований отметили, что: 1) облучение *Pr. vulgaris*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens* вызывает незначительное понижение протеолитических свойств генераций, возникших из облученных бактерий, 2) облучение спор *Bac. subtilis* не оказывает существенного влияния на протеолитическую активность бактерий, выросших из облученных спор, 3) степень омертвления популяций бактерий при тех же самых дозах облучения выше степени понижения их протеолитических свойств, 4) наличие белка в среде облучения бактерий не имеет существенного влияния на протеолитические свойства возникших генераций.

Szulc M., Stefaniakowa A., Stańczak B., Pęconek J. — The influence of radiation on bacterial cells and their proteolytic properties.

The suspensions of bacterial cells and their spores were exposed to radiation with X rays in the environment with and without protein. The doses of radiation ranged from 1 to 100 Gy and in case of spores of *B. subtilis* from 50 to 1000 Gy. It was found that radiation of *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens* and *Ps. aeruginosa* caused an inconsiderable decrease of proteolytic properties of the generation originated from radiated bacteria. Radiation of *B. subtilis* spores did not influence the proteolytic activity of bacterial cells derived from the exposed spores. The degree of wasting away of bacteria exposed to the same radiation was higher than the rate of proteolytic properties decrease. The presence of protein in the surroundings had no influence on proteolytic characteristics of new generations.

MARCIN SZULC, ANNA PLISZKA, JANINA PĘCONEK

Wpływ napromieniowania gronkowców promieniami X na wytwarzanie enterotoksyny i ciepłoopornej dezoksyrybonukleazy

Z Katedry Higieny Produktów Zwierzęcych Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR w Warszawie

Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, że enterotoksyna gronkowcowa jest bardzo oporna na działanie promieni jonizujących. W doświadczeniach Reada i Bradshawa (10) dla zmniejszenia ilości aktywnej enterotoksyny B, rozpuszczonej w buforze weronalowym, z 31 µg/ml do poniżej 7 µg/ml trzeba było dawki 5 Mradów. Aby uzyskać taki sam stopień unieczynnienia enterotoksyny zawartej w mleku dawka promieniowania musiała być zwiększona do 20 Mradów.

W piśmiennictwie brak jest natomiast danych, które dotyczyłyby wpływu napromieniowania na późniejsze wytwarzanie enterotoksyny przez gronkowce, które przeżyły zastosowane dawki promieniowania. Omawiane badania miały więc charakter pierwszych badań orientacyjnych. Uwzględniono w nich wpływ napromieniowania na wytwarzanie przez gronkowce ciepłoopornej dezoksyrybonukleazy. Enzym ten w zasadzie (istnieją bowiem nieliczne wyjątki) jest produkowany tylko przez gronkowce koagulazododatnie (*Staphylococcus aureus*), a warunki jego wytwarzania i trwałości są, zgodnie z badaniami wielu autorów (3, 7, 8, 9, 13), bardzo zbliżone do warunków wytwarzania i trwałości enterotoksyny gronkowcowej. Z tych względów w ostatnich latach proponuje się, zwłaszcza w rutynowych badaniach żywności, zastępowanie oznaczeń enterotoksyny przez oznaczanie ciepłoopornej dezoksyrybonukleazy (12). Oznaczanie bowiem tego enzymu jest znacznie prostsze i nie wymaga kosztownego zestawu surowic i standardowych enterotoksyn.

W przedstawionej pracy uzupełnienie oznaczeń enterotoksyny przez oznaczenia ciepłoopornej dezoksyrybonukleazy wydawało się interesujące, choćby dla stwierdzenia czy nie zachodzą jakieś istotne różnice w efekcie napromieniowania na wytwarzanie enterotoksyny i DN-azy. Ponadto enzym ten można było oznaczać w próbkach napromieniowanych już po stosunkowo krótkim okresie inkubacji, gdy oznaczanie uchwytanych ilości enterotoksyny wymagało dłuższego namnażania. Toteż na przykładzie DN-azy łatwiej można było uchwycić przejściowe zmiany metabolizmu powstające w wyniku napromieniowania.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono z dwoma szczepami gronkowców *Staphylococcus aureus* nr 262, wytwarzającym enterotoksynę B i *Staphylococcus aureus* nr 100, wytwarzającym enterotoksynę A. Te standardowe szczepy oraz enterotoksyny A i B oraz homologiczne surowice antyenterotoksyczne otrzymano dzięki uprzejmości Dr M. S. Bergdolla (Food Research Institute, Univ. of Wisconsin, Madison, USA).

Napromieniowanie przeprowadzono w 2 środowiskach, a mianowicie:

— w środowisku o małej (ok. 0,2%) zawartości białka, rozcieńczając 18-godzinne hodowle gronkowców fizjologicznym roztworem soli (PBS) w stosunku 1:4 (hodowle bulionowe),

— w środowisku białkowym, rozcieńczając hodowle bulionem, również w stosunku 1:4 (zawartość białka ok. 1%).

Do napromieniowania próbek używano aparat rentgenowski o następujących parametrach pracy: napięcie lamp — 200 kV, natężenie — 20 mA, filtracja promieni — 1 mm Al, moc dawki — 11 radów/s tj. 0,11 Gy/s. Stosowano dawki: 1, 10, 50, 200 i 400 Gy.